



10/502307

*Ministero delle Attività Produttive*  
*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*  
*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*  
*Ufficio G2*

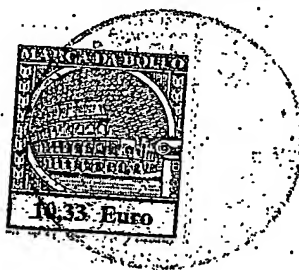
REC'D 19 MAR 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

INV. IND.

N. RM2002A000049 DEL 30.01.02

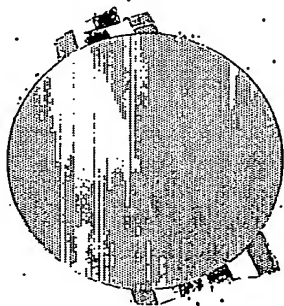


*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

13 FEB. 2003

Roma, li .....



IL DIRIGENTE

*Elena Marinelli*

Sig.ra E. MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 3 / 0 / 0 1 / 2 0 0 2

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCO

A. RICHIEDENTE

1) Denominazione

2) Denominazione

RM 2007 A 000049  
BIOSTRANDS S.r.l.

D. TITOLO

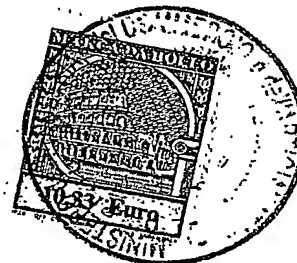
"Frammenti Fab di anticorpi monoclonali umani diretti contro la glicoproteina E2 di HCV e dotati di potere neutralizzante *in vitro*".

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un anticorpo umano, o frammenti funzionali di esso, anti-proteina E2 del virus dell'epatite C, HCV, in grado di avere un attività neutralizzante *in vivo*; una composizione per terapia anti-HCV comprendente in quantità terapeuticamente efficaci l'anticorpo; una composizione per uso topico sotto forma di gel, crema, pomate, ovuli; nonché l'uso dell'anticorpo per la validazione di un vaccino anti-HCV.



M. DISEGNO

## DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "Frammenti Fab di anticorpi monoclonali umani diretti contro la glicoproteina E2 di HCV e dotati di potere neutralizzante *in vitro*"

Titolare: BIOSTRANDS S.r.l.

Inventori: Roberto Burioni

\* \* \*

L'invenzione concerne frammenti Fab di anticorpi monoclonali umani diretti contro la glicoproteina E2 di HCV e dotati di potere neutralizzante *in vitro*. Il virus dell'epatite C (HCV) infetta circa il 4% della popolazione mondiale (World Health Organization, 1999). Più dell'80% dei soggetti entrati in contatto con questo patogeno sviluppa un'infezione persistente, non riuscendo a liberarsi dall'agente virale, con un rischio consistente di gravi malattie epatiche, come epatite cronica, cirrosi e carcinoma epatocellulare [1, 2].

La terapia dell'infezione cronica, basata sull'uso combinato di interferone e ribavirina, è costosissima, con pesanti effetti collaterali e modestamente efficace (solo 1 paziente su 4 presenta risultati a lungo termine) [3, 4]. L'infezione virale non fornisce una immunità protettiva; questo fatto, insieme alla variabilità altissima di questo virus per quanto riguarda la struttura antigenica riconosciuta dal sistema immune, ha reso fino ad ora impossibile sia una sieroterapia efficace, sia la messa a punto di vaccini in grado di proteggere gli individui dall'infezione. Risulta pertanto evidente come nuove strategie antivirali siano fortemente richieste.

ING. BARZANO & ZAVARDO ROMA SPA

Gli autori della presente invenzione hanno clonato i geni codificanti per un gran numero di frammenti anticorpali Fabs umani diretti contro una delle proteine di HCV, la glicoproteina esterna E2, ritenuta il più importante bersaglio contro il quale è diretta la risposta immune protettiva [5]. Tuttavia la valutazione dell'attività biologica di tali frammenti anticorpali non è semplice, non essendo disponibili sistemi *in vitro* affidabili per determinare la attività neutralizzante nei confronti di HCV. Pertanto gli autori hanno potuto solo valutare e descrivere la variabile capacità dei diversi Fabs di inibire il legame della proteina E2 alla cellula bersaglio, senza poter dimostrare una correlazione tra tale attività e quella neutralizzante dei sieri [5].

Nella pubblicazione di Burioni et al., (2001) (6), si dimostra come alcuni degli anticorpi anti-E2 prodotti da pazienti infettati con HCV hanno un effetto negativo, rendendo il virus meno sensibile alla risposta immune dei soggetti stessi, probabilmente legandosi all'antigene E2 e modificandone la conformazione [6]. Ciò spiegherebbe perché alti titoli anticorpali anti-E2 non sono direttamente correlati alla protezione dall'infezione.

Bugli et al., 2001 (7) rivela la mappa degli epitopi della proteina E2 in grado di legare *in vitro* il pannello di Fabs umani anti-E2, rivelando quattro regioni discrete contro le quali è diretta la risposta immune (fig. 2) [7]. La presenza di anticorpi nel siero di pazienti persistentemente infettati contro una o più di tali regioni potrebbe essere associata a complicazioni, ad una minore efficacia della terapia e anche ad una prognosi diversa.

Risulta pertanto evidente l'esigenza di fornire un metodo per la determinazione di anticorpi in un fluido biologico diretti verso diversi epitopi della proteina E2 di HCV. In un aspetto della presente invenzione si fornisce pertanto tale metodo.

Inoltre gli autori dell'invenzione hanno anche valutato l'attività neutralizzante dei diversi anticorpi anti-E2 in un sistema di pseudotipi virali, cioè di virus esternamente del tutto simili a HCV, ma in grado, dopo essere entrati nella cellula bersaglio, di produrre una proteina che produce fluorescenza [8]. Il metodo, rivelando la presenza o meno di fluorescenza delle cellule, fornisce una misura diretta dell'attività neutralizzante *in vivo* di anticorpi anti-E2 diretti verso epitopi diversi. Sorprendentemente gli autori hanno trovato che due degli anticorpi saggiati, e137 ed e301, sono in grado di neutralizzare il virus a concentrazioni raggiungibili con un'unica somministrazione di una preparazione degli stessi anticorpi per via parenterale; altri due anticorpi non hanno alcuna attività neutralizzante, e uno addirittura è in grado di promuovere l'infezione virale.

La messa a punto del metodo di dosaggio delle diverse popolazioni di anticorpi in un paziente rappresenta un valido strumento diagnostico e prognostico con la potenzialità di distinguere i soggetti affetti destinati a sviluppare pericolose complicazioni da quelli con prognosi più favorevole. Ciò eviterebbe la somministrazione a questi ultimi di una terapia di scarsa efficacia gravata di notevoli effetti collaterali, anche con un notevole risparmio economico.

Poiché gli epitopi di E2, così identificati, non sono riproducibili per sintesi *in vitro* di peptidi [5], il metodo dell'invenzione rappresenta l'unico modo per determinare la quantità di anticorpi diretti verso diverse parti della proteina E2, e correlati con dati clinici e epidemiologici.

L'identificazione di anticorpi anti-E2, in formato Fabs umani, con una buona capacità neutralizzante rende possibile la loro produzione su larga scala e l'utilizzo come medicamento nella terapia anti-HCV, o come agente di prevenzione come preparato topico per inibire la trasmissione virale in soggetti a rischio (coppie con stato discordante per HCV, personale professionalmente esposto, ecc.).

Gli anticorpi dell'invenzione possono essere vantaggiosamente utilizzati per valutare *in vitro* molecole candidate per vaccino anti-HCV, cioè in grado di stimolare gli anticorpi neutralizzanti, ma non quelli inefficaci o addirittura negativi.

Infine la disponibilità di anticorpi umani neutralizzanti in grado di riconoscere un largo spettro di virus può risultare decisiva per produrre vaccini artificiali. Gli anticorpi neutralizzanti descritti possono essere usati come "stampo" per mettere a punto vaccini (fatti di peptidi, o di anticorpi anti-idiotipo) in grado di suscitare una risposta cross-reattiva e neutralizzante.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un anticorpo umano, o frammenti funzionali di esso, anti-proteina E2 del virus dell'epatite C, HCV, in grado di avere un attività neutralizzante *in vivo*.



In una forma particolare di attuazione l'anticorpo dell'invenzione è l'anticorpo e137 caratterizzato dal fatto di avere le seguenti sequenze amminoacidiche della parte variabile delle catene pesante e leggera:

**e 137 Catena Pesante (HC)**

LLEQSGSEVKVP GSSLKVSCKTSGGTFSTYTF SWVRQAPGQGLEWMGGITPII  
GIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRLRSEDTAVYYCAKTSEVTATGR  
TFEYSAMDVWGQGT

**e 137 Catena Leggera (LC)**

MAELTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
LQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLPEDFATYYCQHLNTPWTFGQGT

In una forma alternativa di attuazione l'anticorpo dell'invenzione è l'anticorpo e301 caratterizzato dal fatto di avere le seguenti sequenze amminoacidiche della parte variabile delle catene pesante e leggera:

**e 301 Catena Pesante HC**

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSC TTS GGTLSDYGFNWL RQAPGQGP EWMGGI I I PLF  
RRTTYGQKFQGR L TITADESTGATY MELSSLRSDDTAVYYCAREKVS VLTGGK  
SLHYFEYWGKGT

**e 301 Catena Leggera LC**

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIYDTSS  
RATGVPARFSASGSGTQFTLTISSLQSEDFALYYCQQYNDWPSTFGQGT

E' ulteriore oggetto dell'invenzione una composizione per terapia anti-HCV comprendente in quantità terapeuticamente efficaci almeno uno degli anticorpi dell'invenzione. Preferibilmente la composizione è fornita in forma purificata per uso parenterale oppure in altra formulazione per uso topico, sotto forma di gel, crema, pomata, ovuli, con gli eccipienti noti agli esperti del settore.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un acido nucleico codificante per ognuno degli anticorpi dell'invenzione. Vantaggiosamente l'acido nucleico può essere compreso in un vettore di espressione, in grado di esprimere in maniera efficace l'anticorpo dell'invenzione in procarioti o

DEPOSITO IN DATA 24/03/2004



anche in eucarioti. In una forma preferita il vettore ricombinante ulteriormente comprende una sequenza nucleotidica codificante per un peptide segnale, sostanzialmente contigua alla sequenza codificante per l'anticorpo dell'invenzione, in grado di esportare al di fuori dell'ambiente cellulare l'anticorpo stesso.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione l'uso del vettore ricombinante come descritto in terapia genica.

L'invenzione verrà ora descritta in sue forme di realizzazione esplicative, ma non limitative dell'invenzione stessa, facendo riferimento alle seguenti figure:

Fig. 1 FIT: PRESUPPOSTI TEORICI. Nel riquadro (A) è rappresentato il legame di un Fab-FLAG al proprio epitopo in assenza di competitori. La preincubazione dell'antigene con il siero di pazienti permette, utilizzando la stessa concentrazione di Fab presente in (A), di valutare da un punto di vista quantitativo la presenza nel siero di anticorpi diretti contro lo stesso epitopo riconosciuto dal Fab. Nei riquadri (B) e (C), infatti, gli anticorpi legati, competendo con il Fab, ne diminuiscono in proporzione la quota legata rispetto al riquadro (A). Nei riquadri (D) ed (E), invece, la presenza di anticorpi non diretti contro l'epitopo specifico non influenza minimamente il legame del Fab.

Fig. 2 A e B: Grafico di inibizione del legame di e8-FLAG (A) e di e509-FLAG (B) a HCV/E2 da parte di sieri contenenti concentrazioni note di e8-IgG1 e di e509-IgG1 (anticorpi interi diretti contro gli epitopi riconosciuti dai Fab omonimi). E' evidente come l'inibizione del legame dei Fab si osservi solo in presenza dell'anticorpo intero dotato della

# THE GREAT SUNDAY

**Fig. 4: Mappa bidimensionale degli epitopi su cellule B umane presenti sulla superficie di HCV/E2 come riconosciuti dagli anticorpi monoclonali usati in questo studio. I cerchi in sovrapposizione indicano la inibizione reciproca. I Fabs con attività neutralizzante dello pseudotipo VSV/HCV sono sottolineati. La regione putativa che media l'interazione di HCV/E2 con il bersaglio cellulare è indicata dalla linea tratteggiata. La regione putativa riconosciuta dagli anticorpi neutralizzanti è indicata da un cerchio nero pieno. Per le modifiche che possono essere indotte dalle interazioni antigene-anticorpo, il diagramma non corrisponde alla vera mappa fisica.**

## **Materiali e metodi**

**Fabs anti-HCV Fabs e produzione di IgG1 di intera lunghezza**

La generazione, purificazione e caratterizzazione dei Fabs anti-HCV/E2 è descritta [5]. FLAG-Fabs (Fabs marcati con un epitopo FLAG

fuso al carbossiterminale della catena pesante con un ponte pentapeptidico) sono costruiti e purificati come descritto [6]. Per la validazione la standardizzazione del saggio è stata attuata con geni codificanti i Fab per costruire anticorpi monoclonali umani di intera lunghezza (HuMabs), che sono stati inseriti in un appropriato vettore eucariotico per la produzione in cellule trasfettate [9]. Gli HuMabs presenti nel sovrantante di coltura sono stati purificati per immunoaffinità come descritto [10] e valutati per PAGE. La quantità di anticorpi umani era valutata con un immunosaggio sandwich immunoassay. Tutti gli anticorpi e i Fabs sono conservati a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *Sieri e campioni*

I sieri ottenuti da donatori sani e da pazienti positivi per HCV sono stati analizzati con kit diagnostici commerciali (Ortho, Raritan, NJ), seguendo procedure standard. Per la preparazione di campioni di controllo con note quantità di anticorpi diretti verso un dato epitopo, sieri negativi per HCV sono stati uniti a HuMabs purificati e concentrati in PBS, e trattati come i sieri positivi e negativi.

#### *Saggio del titolo di inibizione del Fab (FIT)*

Lo scopo del saggio è di attribuire la capacità di sieri di inibire il legame di un Fab marcato al suo epitopo, ottenendo così una misura indiretta della quantità di anticorpi serici che legano l'epitopo (Fig. 1) I FLAG-Fabs sono stati purificati [10] e saggiati in saggio ELISA specifico per i FLAG-Fab, per determinare la concentrazione da usare in esperimenti di inibizione. In breve, preparazioni di FLAG-Fab a concentrazioni note sono state titolate per ELISA [11], in cui le piastre



ricoperte di antigene sono bloccate per 1 h a 37°C con PBS/1%BSA. Dopo rimozione della soluzione di blocco, 50 µl di diluizioni progressive di FLAG-Fab in PBS/BSA1% sono state aggiunte alle piastre e incubate per 2 h a 37°C. Le piastre sono lavate 10 volte con PBS/0.05% Tween-20 in un sistema di lavaggio automatico di piastre (Sorin, Saluggia, Italy), prima di aggiungere 50 µl di 10 µg/ml di soluzione di anticorpo monoclonale di topo M2 anti-FLAG (Sigma, St. Louis, Mo; 10 µg/ ml in PBS) in PBS/BSA1%. Dopo un'incubazione di 1 h a 37°C, le piastre sono lavate 10 volte con PBS/Tween-20 come sopra e il legame dell'anticorpo monoclonale di topo è rivelato con IgG anti-topo di capra coniugate con perossidasi di rafano (Pierce; 1:8,000 in PBS). Il substrato è aggiunto e le piastre lette ad OD<sub>450</sub> in un lettore automatico di piastre dopo 30 min di incubazione a temperatura ambiente al buio. Tutti i saggi sono effettuati almeno in duplicato. Un antigene (BSA) come controllo negativo era sempre incluso e la lettura di OD sottratta come "background".

Per la determinazione del Fab Inhibition Titer (FIT) dei sieri, una concentrazione di FLAG-Fabs purificati che danno in condizioni standard una lettura di OD<sub>450</sub> uguale al 50% della lettura massima era usata per ulteriori esperimenti ELISA con inibizione con Fab. Per questi esperimenti, le piastre sono ricoperte e bloccate come sopra descritto. Diluizioni progressive 1:4 in PBS/BSA 1% di siero sono aggiunte a 50 µl per pozzetto ELISA. Dopo 2 h di incubazione a 37°C, FLAG-Fab purificato è aggiunto direttamente alle diluizioni di siero per raggiungere la concentrazione finale desiderata. Le piastre erano incubate per 30

min aggiuntivi e processate come già descritto per FLAG-Fab ELISA.

Un campione di controllo positivo, contenente un eccesso 20:1 di Fab purificato non marcato, corrispondente al 100% di inibizione, è incluso.

Un campione come controllo negativo, contenente un eccesso di un Fab di controllo non influente [12] e corrispondente al 0% di inibizione, è anche incluso. I risultati finali sono determinati come % di inibizione con la formula: % di inibizione =  $100 \times (\text{OD}_{450} \text{ della sonda FLAG-Fab da sola} - \text{OD}_{450} \text{ della sonda FLAG-Fab con il siero competente}) / \text{OD}_{450} \text{ della sonda FLAG-Fab da sola}$ .

La più alta diluizione di siero che dà più del 70% di inibizione del legame FLAG-Fab è considerata come il Fab Inhibition Titer (FIT) per quel dato epitopo e per quel dato siero.

### Risultati

La concentrazione di FLAG-Fab appropriata da utilizzare nel saggio è determinata per ciascun FLAG-Fab e varia da 10 µg/ml (e8, e20, e137, e301, e509) a 0.1 µg/ml (e10-B). Le sequenze amminoacidiche delle catene leggere e pesanti dei vari anticorpi sono qui di seguito riportate:

#### e8 HC

LLEQSGAEVKMPGATVKVSCQSSRYTFTSYGIGWVRQAPGQGLEWMGWISGYT  
HETKYAQSFQGRVTMTAETSTGTAYMELRSLRSDDTATYYCARDGGGRVVVPP  
THLRAFDVWGQGT

#### e8 LC

MAELTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASHRVNNNFLAWYQQKPGQAPRLLISGAS  
TRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYCQQYGDSPLYSFGQGT

#### e10 HC

LLESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGVSISYGGRGVSYGWVRQSPGKGLEWIGHI  
YYFGDTFYNPSSLNNRATISIDSSKNQFSLKLKSVTASDTALYFCARSTLQYFD  
WLLTREAAYSIDFWGQGI

e10 LC

MAELTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGV TILLAWYQQKPGKPPKALIYAASS  
LQSGVPSRFSGSGSDTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQLNTYPWTFGQGT

e20 HC

LLEQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDHYGINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTT  
TYAQKFQGRATITADDSTGTAFLELTRLT FDDTAVYFCATPHQLHVLRGKKAL  
SPWDYWGQGT

e20 LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQAPSLLIYGTST  
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNDWPSTFGQGT

e137 HC

LLEQSGSEVKVPGSSSLKVSCKTSGGTFS TYTFSWVRQAPGQGLEWMGGITPII  
GIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRLRSED TAVYYCAKTSEVTATRGR  
TEFFYSAMDVWGQGT

e137 LC

MAELTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS T  
LQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISR LQPEDFATYYCQHLNTYPWTFGQGT

e301 HC

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSC TTSGGTSLSDYGFNWL RQAPGQGP EWMGGIIPLF  
RRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYME LSSLRSDDTAVYYCAREKVS VLTGGK  
SLHYFEYWGKGT

e301 LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIYDTSS  
RATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQYNDWPSTFGQGT

e509 HC

LLEESGAEVKKPGSSVKVSKTSGDTFRYGITWVRQAPGQGLEWMGQIMPTFA  
TATYAQR FQGRVTISADESTSTAYLEVRSLRSED TAVYYCATPRQVTILRGPK  
ALSPWDYWGQGT

e509 LC

MAELTQSPATLSASPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLISGAST  
RATGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNWPPHFGQGT

Le sequenze nucleotidiche codificanti per i frammenti Fab sopra  
riportati sono di seguito indicate :

e8 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGATGCCTGGGGCCACAGTGAAGGT  
CTCCTGCCAGTCTTCCCGTTACACCTTCACCAGTTACGGTATCGGCTGGGTGC  
GACAGGCCCTGGACAGGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGGATACACC  
CATGAGACAAAATATGCACAGAGTTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGCAGA  
GACATCCACGGGCACAGCGTATATGGAGTTGAGGAGCCTGCGGTCTGACGACA

MAE BAZZIO & ZAMBINO ROMA SpA

CGGCCACATATTACTGCGCGAGAGATGGAGGAGGGAGGGTGGTAGTGCCGCCT  
ACTCATCTACGTGCTTTTGATGTCTGGGGTCAAGGGACG

e8 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCACAGAGTCAATAACAACCTTCTTAGCCT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCT  
ACCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGA  
CTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGATGATTTTGAGTTTATTATT  
GTCAGCAGTATGGTGACTCACCTCTTTATTCTTTTGGCCAGGGGACC

e10 HC

CTGCTCGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCAC  
CTGCACCGTCTCCGGTGTCTCCATCAGTTACGGTGGTCGTGGCGTTTCCTACT  
GGGGTTGGGTCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGCCACATC  
TACTACTTTGGAGACACCTTCTACAACCCGTCCCTCAACAATCGAGCTACCAT  
ATCAATAGACTCATCCAAAACAGTTCTCCCTCAAGCTCAAGTCTGTGACTG  
CCTCAGACACGGCCCTGTATTTCTGTGCCAGGAGCACCTACAGTATTTTGAC  
TGGTTATTGACACGGGAGGCTGCCTACTCCATTGACTTCTGGGGCCAGGGAAT  
A

e10 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACCG  
AGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGGGCGTCACCATTCCTTTTAGCCTGGT  
ATCAGCAAAAGCCAGGGAAACCCCTAAGGCCCTGATTTATGCTGCATCGTCT  
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGTTCTGACACAGATTT  
CACTCTCACAATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTC  
AACAACCTTAACACTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAGGGGACC

e20 HC

CTGCTCGAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGT  
CTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACCACTATGGTATCAACTGGGTGCGACAGGCCC  
CTGGACAAGGGCTGGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCTGTCTTTGGCACAAC  
ACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCATACCGCGGACGACTCCAC  
GGGGACGGCCTTTTTGGAGCTGACCAGACTGACATTTGACGACACGGCCGTCT  
ATTTCTGTGCGACACCTACCAACTGCATGTCTCCGGGGCGGTAAAGCCCTC  
TCCCCCTGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

e20 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGTAACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTCCTCATCTACGGAACATCTACC  
AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTT  
CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTC  
AGCAGTATAATGATTGGCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

e137 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAAGTAAAAGTGCCCGGGTCCCTCGTTGAAGGT  
CTCCTGCAAGACTTCTGGAGGCACCTTCAGCACCTATACTTTAGCTGGGTGC  
GACAGGCCCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGGGGGATCACCCCTATCATT



GGCATCGCAAACCTACGCACGGAACCTTCCAGGACAGAGTCACCATCACCGCGGA  
CGAATCCACGAGCACGGTCTACATGGAGGTGAGGAGGCTGAGATCTGAGGACA  
CGGCCGTATATTATTGTGCGAAACCTTCGGAAGTAACAGCCACTAGAGGGCGG  
ACTTCTCTACTCCGCTATGGACGTCTGGGGTCAAGGGACC

e137 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATAAGCAATTATTTAGCCTGGT  
ATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACT  
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTTGGACAGAATT  
CACTCTCACAATCAGCCGCCTCCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC  
AACACCTTAATACTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACC

e301 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAGGTGAAGAAACCTGGGTCTCGGTGAGGGT  
CTCGTGACGACTTCTGGAGGCACCTTGAGCGACTATGGTTTCAACTGGTTAC  
GACAGGCCCTTGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTTTGTTT  
CGAAGAACAACCTACGGACAGAAGTTCCAGGGCAGACTCACCATTACCGCGGA  
CGAGTCCACGGGCGCAACCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACA  
CGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGAGAAAGTTTCGGTCTCACAGGCGGAAAG  
TCACTCCATTACTTTGAATATTGGGGCAAGGGAACC

e301 LC

ATGGCCGAGCTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTCCTCATCTATGACACATCTTCC  
AGGGCCACTGGTGTCCAGCCAGGTTTCAGTGCCAGTGGGTCTGGGACGCAGTT  
CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTC  
AGCAGTATAATGATTGGCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

e509 HC

CTGCTCGAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGTCTCGGTGAAGGT  
CTCCTGCAAGACTTCTGGAGACACCTTCAGATATGGTATCACGTGGGTGCGAC  
AGGCCCTTGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACAGATCATGCCTACGTTTGCG  
ACAGCAACCTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTTCCGCGGACGA  
ATCCACGAGCACAGCCTACTTGAGGTGCGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGG  
CCGTCTATTACTGTGCGACACCTCGCCAAGTTACTATACTTCGGGGACCTAAA  
GCCCTCTCCCCTTGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

e509 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCTCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGCAACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCACC  
AGGGCCACTGGTGTCCCGGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTT  
CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTC  
AGCAGTATAATAACTGGCCTCCCCACTTTGGCCAGGGGACC

MG 27210 & 27210 RNA 5A



Un saggio FLAG-Fab ELISA su molecole di Fab purificate e marcate dà risultati molto specifici e riproducibili. La determinazione del FIT è effettuata su 10 sieri negativi per HCV; il titolo è riproducibilmente  $>1:20$ , il limite superiore di rivelazione del saggio, indicando che nessuna inibizione avviene in assenza di anticorpi specifici anti-HCV.

Per dimostrare che il FIT è una misura efficace degli anticorpi diretti verso epitopi riconosciuti dai FLAG-Fabs utilizzati, la stessa analisi è effettuata su campioni di controllo preparati unendo sieri negativi con anticorpi monoclonali umani di data specificità, ottenendo campioni con note quantità di IgG diretti verso gli epitopi di HCV/E2 definiti dai Fabs. I risultati, mostrati nelle Fig. 2 A e B, mostrano una buona correlazione tra il FIT e la quantità di anticorpi, indicando che il FIT può fornire informazioni affidabili sulla quantità di anticorpi specifici per epitopi nel siero di un paziente.

Infine, il FIT è sempre positivo in sieri positivi per HCV, con valori in un ampio intervallo di diluizioni. Il FIT è molto diverso per i diversi Fab nello stesso campione di siero, con una considerevole eterogeneità tra i pazienti.

## **ESEMPIO 2**

### **Materiali e Metodi**

#### ***Frammenti anticorpali umani***

I Fabs utilizzati sono descritti in Bugli et al. (2001) [7] e in Burioni, et al. (1998) [5], e corrispondono a quelli utilizzati nell'Esempio 1. In breve, i geni codificanti per i Fabs sono stati ottenuti da una libreria combinatoriale "phage display" contenente il repertori delle IgG1/kappa

di una donna di 58 anni con epatite cronica con la persistente presenza nel sangue di RNA di HCV, genotipo 1b. I geni selezionati sono inseriti in un appropriato vettore di espressione batterico [13] e le cellule trasformate usate come fonte di Fabs ricombinanti, prodotti e purificati come descritto in [14]. La neutralizzazione del legame di E2 alle cellule (attività NOB) [5, 15] e le reciproche interazioni [7] di queste molecole sono descritte. La presenza di anticorpi simili nel siero di pazienti affetti da HCV è determinata con un saggio ELISA di inibizione [7].

#### *Pseudotipi e saggio di neutralizzazione*

I pseudotipi usati sono caratterizzati e descritti in Matsuura et al., 2001 [8]. In breve lo pseudotipo VSV $\Delta$ G\*/HCVE1-E2 (VSV/HCV) consiste del Vesicular Stomatitis Virus in cui la proteina G dell'"envelope" è sostituita con la proteina chimerica E1-E2 dell'"envelope" di HCV, composta dagli ectodomini delle proteine E1 e E2 del clone di cDNA di HCV di tipo 1b (NIH-J1), fusi alle sequenze segnale al N-terminale, con i domini transmembrana e citoplasmatico della proteina G di VSV [8]. La costruzione dei plasmidi [16] e dei vettori di espressione eucarioti è descritta in [8, 17]. VSV/HCV è preparato infettando cellule CHO che esprimono in maniera costitutiva il cDNA per la proteina chimerica E1-E2 con un VSV ricombinante, in cui la regione codificante per G è sostituita con il gene per la proteina fluorescente verde (GFP) [18]. Lo pseudotipo VSV $\Delta$ G\*/HCVE1-E2 (VSV/G), usato come controllo (e per produrre lo pseudotipo VSV/HCV), è prodotto per infezione con VSV $\Delta$ G\* di una linea cellulare che produce in modo transiente la proteina G. Il saggio di neutralizzazione è effettuato come

descritto [8]. Diluizioni dei Fabs umani ricombinanti purificati sono incubate con  $2.4 \times 10^3$  IU del pseudotipo VSV/HCV o VSV/G per 30 min a  $37^\circ\text{C}$ , e inoculate in cellule HepG2 ( $4 \times 10^4$  cell) preparate in una piastra a 96 pozzetti. Dopo adsorbimento per 60 min a  $37^\circ\text{C}$ , le cellule sono lavate tre volte con DMEM, 10% FBS e incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 16 hr. Le IU del virus sono determinate contando il numero di cellule che esprimono GFP al microscopio a fluorescenza. I dati sono presentati come % di inibizione rispetto a pozzetti di controllo in cui non si è aggiunto anticorpo. I dati sono la media di tre esperimenti in doppio.

### Risultati

#### *Generazione di un pannello di anticorpi monoclonali umani anti-HCV/E2 e caratterizzazione della sequenza*

Il pannello di frammenti Fab di anticorpi monoclonali umani usati rappresenta il repertorio anti-HCV/E2 immune di un paziente con una infezione persistente con HCV genotipo 1b [5, 19]. I frammenti anticorpali selezionati con la HCV/E2 ricombinante purificata del genotipo 1a (ceppo H) [20] espressa in cellule CHO, sono ben caratterizzati e corrispondono ai cloni presenti nel siero di pazienti affetti in maniera cronica [7] con una affinità uguale per HCV/E2. Ciascuno dei cinque anticorpi usati rappresenta una di cinque famiglie in cui l'intero repertorio di anticorpi anti-E2 del paziente è raggruppato. I Fabs che appartengono alla stessa famiglia hanno un'attività biologica simile e forti omologie di sequenza del DNA [5]. Ciascuno dei cinque Fabs riconosce un diverso epitopo sulla superficie di E2 [7]. Le divergenze dalle sequenze relative germ-line sono tipiche di una maturazione



dell'affinità diretta dall'antigene (Tabella 1a e 1b), suggerendo una esposizione prolungata all'antigene stesso.

Tabella 1a e 1b. Mutazioni nelle linee germinali nel gene V delle regioni variabili di anticorpi monoclonali umani anti-HCVE2

Le sequenze sono determinate come descritto Burioni et al., 1998 [5] e allineate con le sequenze delle linee germinali nel database IMGT [21]. La percentuale di mutazioni a livello nucleotidico e amminoacidico sono calcolate secondo il metodo di allineamento di Kabat and Wu [22], considerando la regione "framework" FR 1, FR 2 e FR 3 per le catene pesanti e leggere, la regione che determina la complementarità CDR 1 e CDR 2 per le catene pesanti, CDR 1, CDR 2 e CDR 3 per le leggere.

CATENE PESANTI Tabella 1a

Anticorpo	Gene V	% di nucl. mutati		% aa. mutati	
		FRs	CDRs	FRs	CDRs
e 8	VH1-18	9.5	22.2	14.9	33.3
e 20	VH1-69	9.4	16.9	19	38
e 137	VH1-69	11.5	15.3	14	41.7
e 301	VH1-69	8.9	19.4	15.6	45.8
e 509	VH1-69	5.2	15.9	10.9	33.3

CATENE LEGGERE Tabella 1b

Anticorpo	Gene V	% di nucl. mutati		% aa. mutati	
		FRs	CDRs	FRs	CDRs
e 8	KV 3-20	2.7	16	2.6	33.3
e 20	KV 1- 9	4.3	7.7	9.7	22.2

e 137	KV 1-8	2.2	9	3.2	15.4
e 301	KV 3-15	3.8	14.3	9.7	23
e 509	KV 3-15	3.2	1.3	6.5	0

E' stata determinata anche l'attività di neutralizzazione del legame (NOB) di ciascun frammento Fab [5]; si è trovato che alcuni cloni (e137 e e8) sono incapaci di inibire il legame di HCV/E2 alle cellule, mentre altri lo fanno anche a concentrazioni molto basse (si veda di seguito).

*Neutralizzazione dello pseudotipo virale da parte di Fabs umani ricombinanti*

Due dei Fabs, e8 e e20, che riconoscono differenti epitopi sulla superficie di HCV/E2 [7] non neutralizzano l'infezione dello pseudotipo VSV/HCV, anche ad alte concentrazioni (80 µg/ml). Uno di essi, e20, ha una forte attività NOB [5], confermando che anche anticorpi che inibiscono il legame con E2 possono non essere in grado di prevenire l'infezione virale.

Due altri Fab, e137 e e301, neutralizzano in maniera efficace VSV/HCV ad una concentrazione di 10 µg/ml, mentre gli pseudotipi VSV con la proteina G (pseudotipi VSV/G) non erano influenzati (Figure 3a e 3b). I dati sono in accordo con il fatto che questi due cloni competono per la stessa regione di E2, probabilmente riconosciuta da anticorpi umani con attività neutralizzante, come indicato in una mappa bidimensionale della superficie degli epitopi umani su HCV/E2 (Fig. 4).

Il Fab 509 è al momento l'anticorpo con l'attività NOB più forte, in grado di inibire il legame tra E2 e il bersaglio cellulare a concentrazioni molto basse (Tabella 2). L'incubazione degli pseudotipi VSV/HCV con questo Fab facilita l'entrata del virus in cellule di epatoma fino ad una concentrazione di 1µg/ml. Non si riscontra alcun aumento dell'infettività quando si usano gli pseudotipi VSV/G, escludendo così la possibilità che un'interazione non specifica di questo Fab con la membrana cellulare promuova l'entrata del virus nella cellula (Fig. 3C).

Tabella 2. Caratteristiche degli anticorpi anti-E2

L'attività NOB è calcolata come la concentrazione (in µg/ml) che produce il 50% di neutralizzazione del legame di una preparazione purificata di HCV/E2 alle cellule bersaglio

Clone Fab	50% NOB	Effetto sull'infezione con VSV/HCV
e8	>40 (nessuna)	Nessuno
e20	3 (alta)	Nessuno
e137	40 (bassa)	Inibizione
e301	3 (alta)	Forte inibizione
e509	<0.035 (la più alta)	Aumento

Un anticorpo di controllo [23] non mostra alcun effetto sul sistema degli pseudotipi, essendo incapace di neutralizzare sia VSV/HCV che VSV/G. Lo pseudotipo VSV/G è correttamente neutralizzato da diluizioni fino a 1:1000 di un siero policlonale anti-VSV usato come controllo neutralizzante in questi esperimenti [8] , che non

ha invece alcun effetto su VSV/HCV. Anticorpi policlonali e monoclonali anti-E1 e anti-E2 da diversi ospiti non mostrano alcun effetto neutralizzante sugli pseudotipi VSV/HCV.

L'attività neutralizzante dei Fabs monovalenti dimostra come l'entrata di HCV possa essere inibita senza la necessità di aggregazione o di cross-linking virale; inoltre, il blocco dell'interazione tra il virus e il suo bersaglio cellulare non sembra essere un fattore chiave nella neutralizzazione di HCV. Questi dati spiegano a livello molecolare la mancanza di correlazione tra l'attività NOB del siero e la protezione dalla malattia.

I dati dimostrano inoltre che c'è una forma di protezione crossreattiva da anticorpi nel caso di HCV, in quanto anticorpi anti-E2 selezionati da E2 di genotipo 1a sono in grado di neutralizzare uno pseudotipo con E2 del genotipo 1b.

I risultati mostrano anche che il Fab e509 è in grado di aumentare l'infettività dello pseudotipo VSV/HCV, ma non VSV/G, probabilmente perché si lega in maniera specifica e molto efficace alla regione di E2 che si lega a CD81, una struttura cellulare coinvolta nell'attacco virale alla cellula [24]. Il legame di e509 a E2 potrebbe mimare il legame di E2 ad uno dei suoi bersagli cellulari, e promuovere una modifica conformazionale di E2 simile a quella indotta da CD81. E2 è presente in almeno due stati conformazionali e il legame dell'anticorpo può modificare lo stato sterico modulando l'attività NOB dei Fabs umani senza una competizione del legame [6]. Pertanto il Fab e509 sembra essere rilevante per lo studio delle interazioni tra HCV e la



ING. BATTISTO & ZANARDI ROMA SA

superficie cellulare e potrebbe essere utilizzato in modelli *in vitro* per la valutazione di molecole da usare come vaccini.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Hoofnagle, *Hepatitis C: the clinical spectrum of disease*. Hepatology, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 15S-20S.
2. Cerny and Chisari, *Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence*. Hepatology, 1999. **30**(3): p. 595-601.
3. Fried and Hoofnagle, *Therapy of hepatitis C*. Semin Liver Dis, 1995. **15**(1): p. 82-91.
4. Hoofnagle and di Bisceglie, *The treatment of chronic viral hepatitis*. N Engl J Med, 1997. **336**(5): p. 347-56.
5. Burioni, et al., *Dissection of human humoral immune response against hepatitis C virus E2 glycoprotein by repertoire cloning and generation of recombinant Fab fragments*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 810-4.
6. Burioni, et al., *Non-neutralizing human antibody fragments against Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Modulate Neutralization of Binding Activity of Human Recombinant Fabs*. Virology, 2001. **288**: p. 29-35.
7. Bugli, et al., *Mapping B cell epitopes of Hepatitis C Virus E2 glycoprotein using human monoclonal antibodies from phage display libraries*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9986-9990.



8. Matsuura, et al., *Characterization of Pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins*. Virology, 2001. **286**(2): p. 263-75.
9. Bender, et al., *Recombinant human antibodies: linkage of an Fab fragment from a combinatorial library to an Fc fragment for expression in mammalian cell culture*. Hum Antibodies Hybridomas, 1993. **4**(2): p. 74-9.
10. Barbas, et al., *Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10164-8.
11. Williamson, et al., *Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Feb 1;91(3):1193]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4141-5.
12. Burioni, et al., *Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex viruses 1 and 2 in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 355-9.
13. Burioni, et al., *A vector for the expression of recombinant monoclonal Fab fragments in bacteria*. J Immunol Methods, 1998. **217**(1-2): p. 195-9.

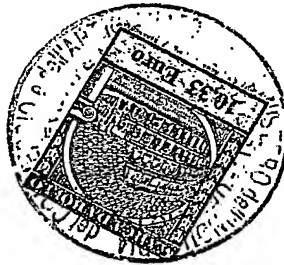
MC. GILBERT & ZAHARU ROMA SPA

- # THE NEW CENTURY

22. Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5<sup>th</sup> ed. 1991, Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services.
23. Burioni, et al., *A new subtraction technique for molecular cloning of rare antiviral antibody specificities from phage display libraries* Res Virol, 1998. **149**(5): p. 327-30.
24. Pileri, et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)  
*Olga Capasso*

ING. BARZANO & ZAKARDO ROMA SPA



## RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo umano, o frammenti funzionali di esso, anti-proteina E2 del virus dell'epatite C, HCV, in grado di avere un'attività neutralizzante *in vivo*.

2. Anticorpo secondo la rivendicazione 1 essendo l'anticorpo e137 caratterizzato dal fatto di avere le seguenti sequenze delle parti variabili della catena pesante e della catena leggera:

### e 137 Catena Pesante (HC)

LLEQSGSEVKVPGSSLKVSCKTSGGTFSTYTFSWVRQAPQGLEWMGGITPII  
GIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRRLRSED TAVYYCAKTSEVTATRGR  
TFFYSAMDVWGQGT

### e 137 Catena Leggera (LC)

MAELTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
LQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLLQPEDFATYYCOHLNTYPWTFGQGT

3. Anticorpo secondo la rivendicazione 1 essendo l'anticorpo e301 caratterizzato dal fatto di avere le seguenti sequenze delle parti variabili della catena pesante e della catena leggera:

### e 301 Catena Pesante HC

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCCTTSGGTLSDYGFNWLROAPGQGPPEWMGGIIPLF  
RRTTYGQKFQGRITITADESTGATYMESSLRSDDTAVYYCAREKVSVLTTGGK  
SLHYFEYWGKGT

### e 301 Catena Leggera LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIYDTSS  
RATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTFGQGT

4. Composizione per terapia anti-HCV comprendente in quantità terapeutamente efficaci almeno uno degli anticorpi secondo le rivendicazioni precedenti.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4 per uso topico sotto forma di gel, crema, pomate, ovuli.

ING. G. ZANARDI & C. ZANARDI ROMA SPA

6. Uso dell'anticorpo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 per la validazione di un vaccino anti-HCV.

7. Acido nucleico codificante l'anticorpo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3.

8. Vettore ricombinante di espressione comprendente l'acido nucleico secondo la rivendicazione 7 in grado di esprimere in maniera efficace l'anticorpo delle rivendicazioni da 1 a 3 in procarioti o in eucarioti.

9. Vettore ricombinante secondo la rivendicazione 8 ulteriormente comprendente una sequenza nucleotidica codificante per un peptide segnale, sostanzialmente contigua alla sequenza codificante per l'anticorpo delle rivendicazioni da 1 a 3, in grado di esportare al di fuori dell'ambiente cellulare detto anticorpo.

10. Uso del vettore ricombinante secondo la rivendicazione 9 in terapia genica.

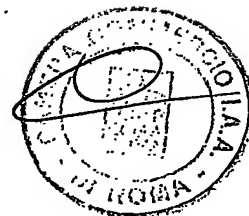
11. Metodo per la determinazione della presenza di anticorpi diretti verso differenti epitopi della proteina E2 del virus dell'epatite C (HCV) in un fluido biologico comprendente le fasi di:

- a) determinare la presenza di anticorpi in detto fluido in grado di inibire il legame di specifici Fab umani diretti verso diversi epitopi della proteina E2;
- b) correlare la presenza di anticorpi così dosati con caratteristiche cliniche dei pazienti, quali la prognosi, la sensibilità alla terapia, la infettività.

Roma, 30 GEN. 2002  
p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

1/7

RF 2002 A 00049

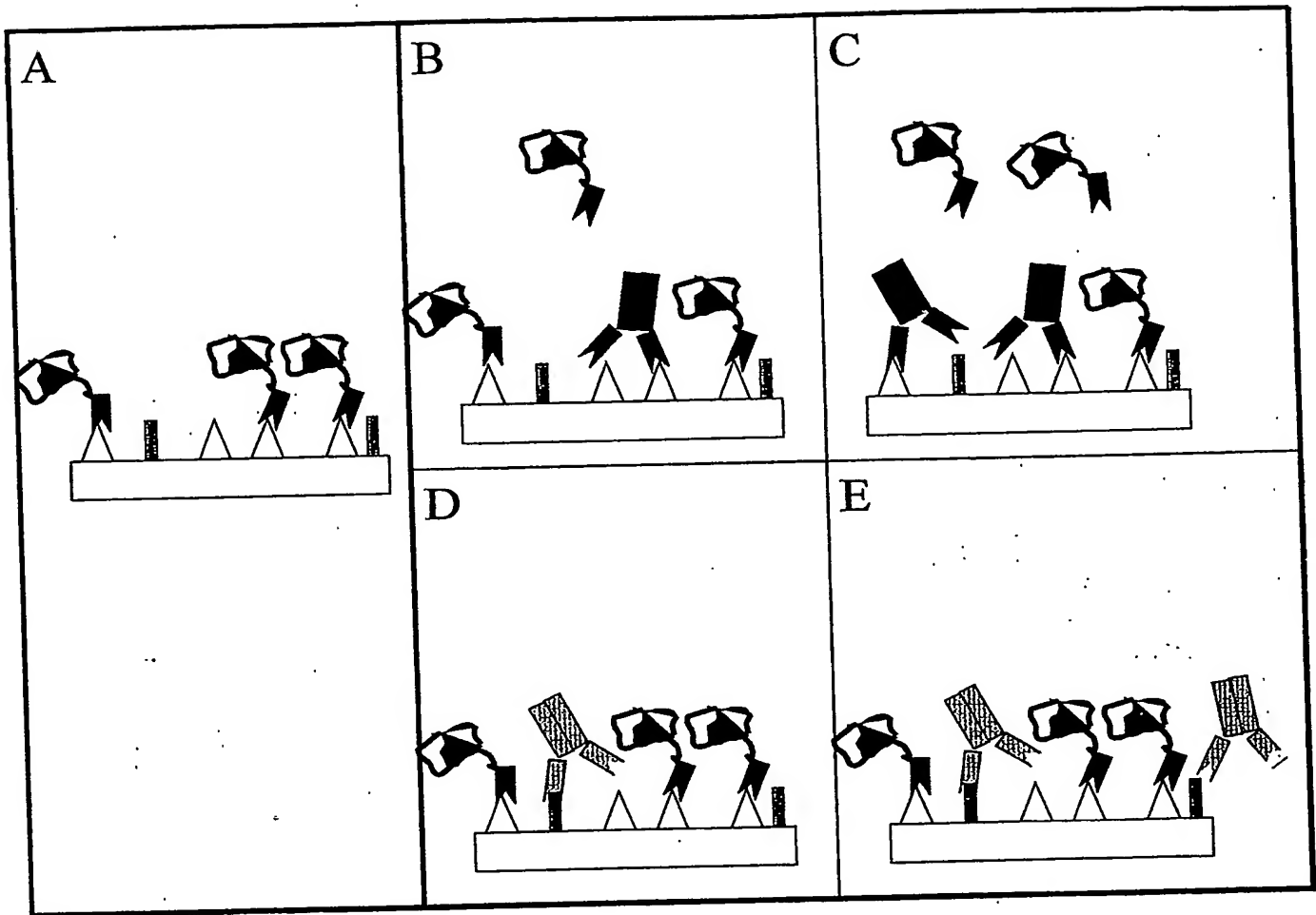


FIG. 1

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



2/1

RM 2002 A 000049



# ENV 8-flag FIT

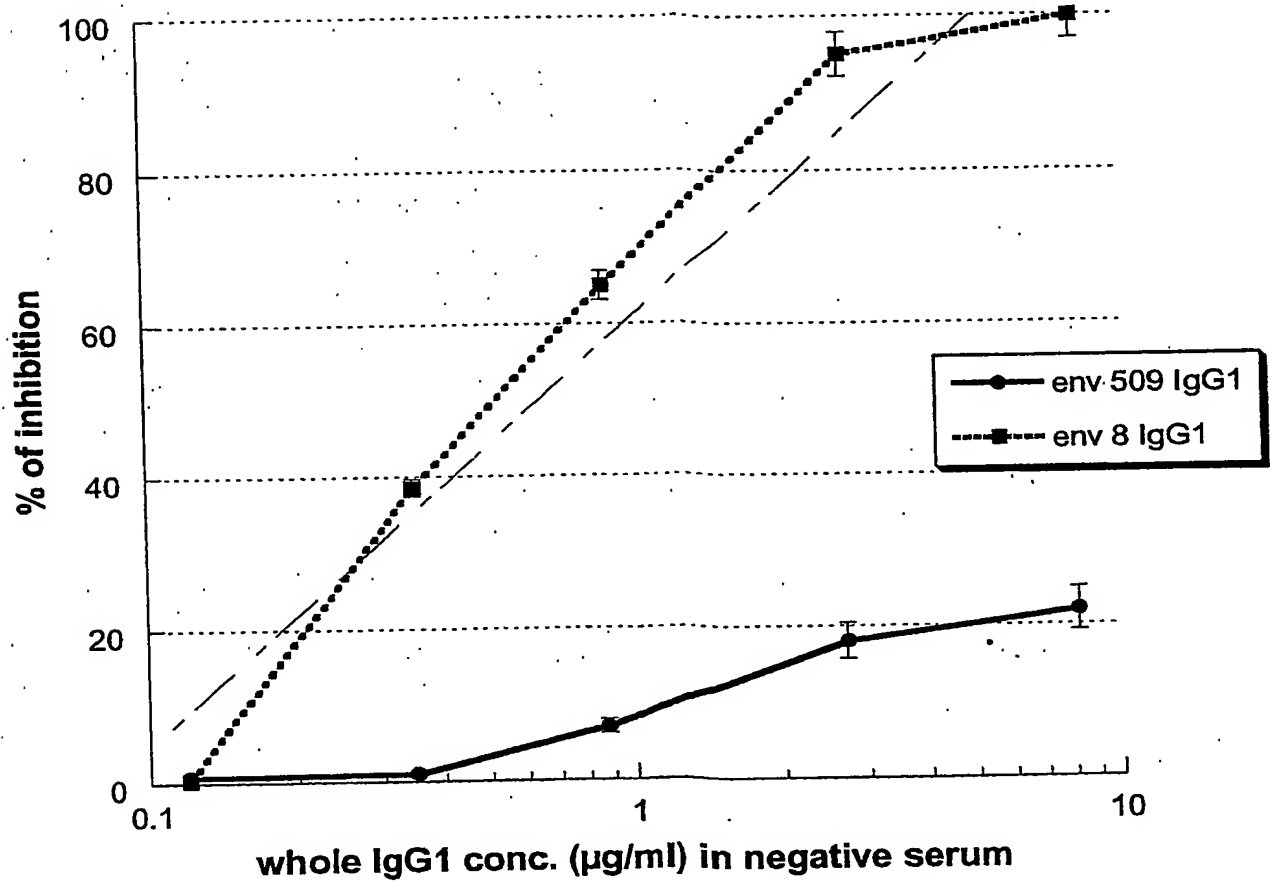


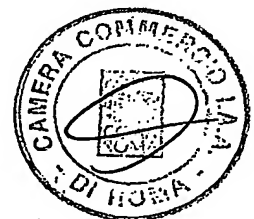
Fig. 2A

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso



3/7

RM 2002 A 000049

# ENV 509-flag FIT

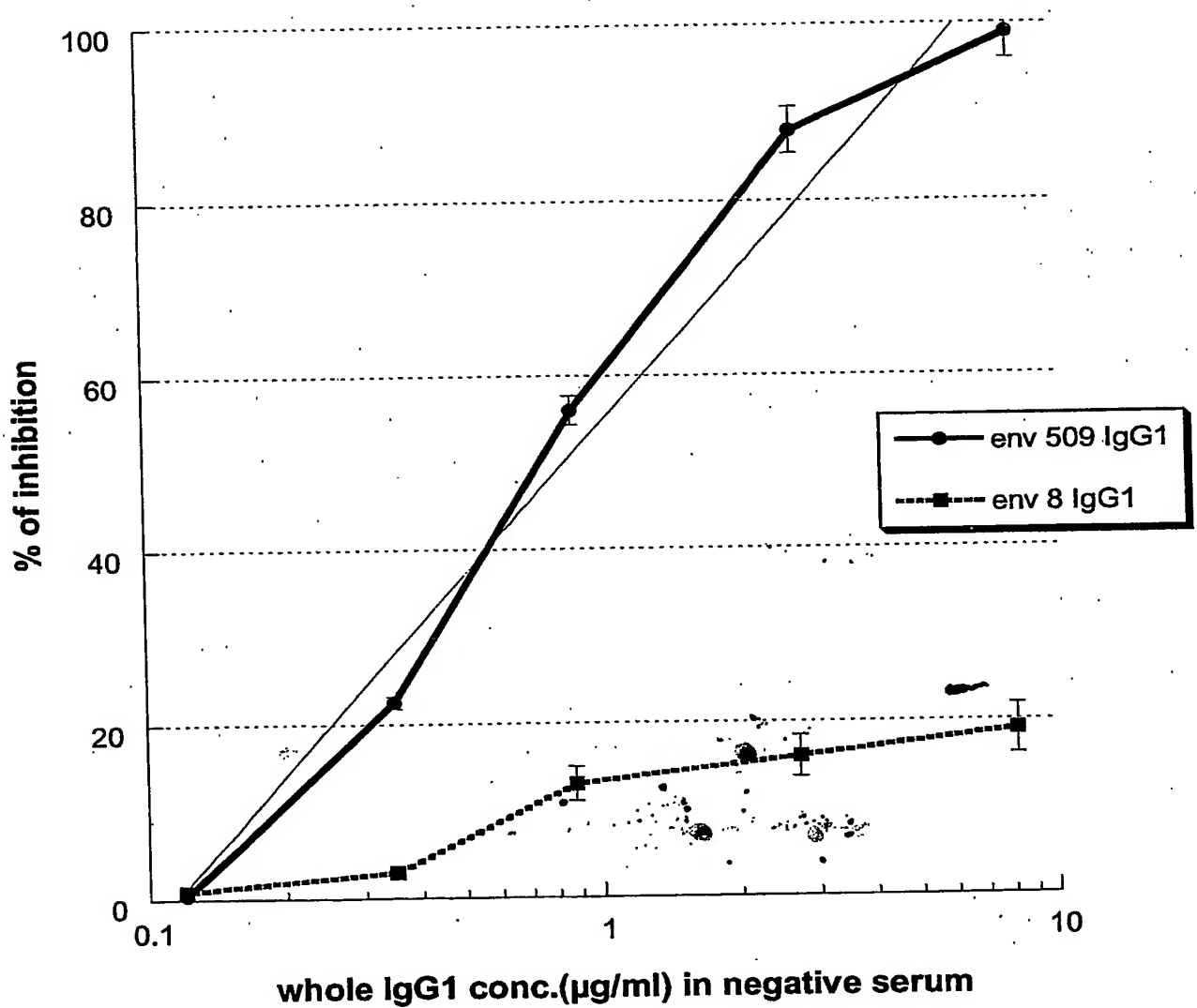
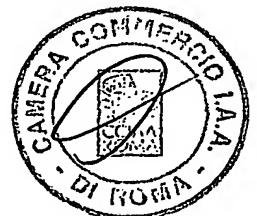


Fig. 2 B

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.





4/7

RM 2002 A 000049

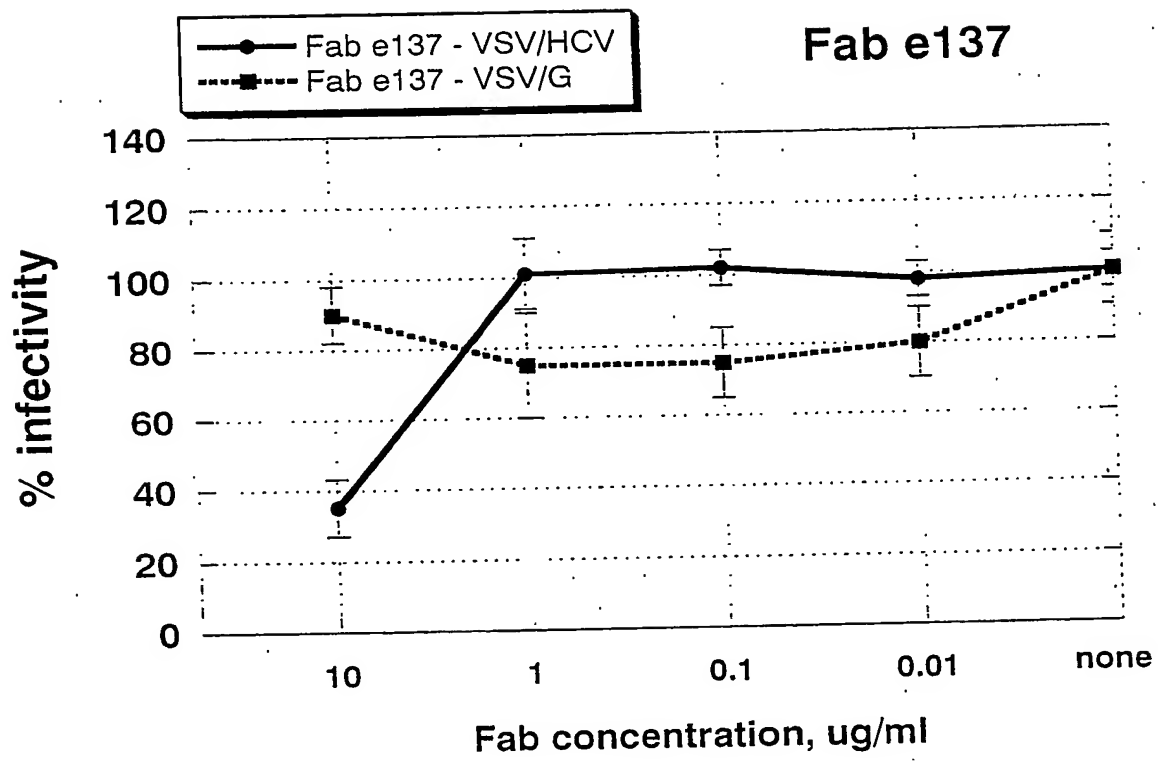
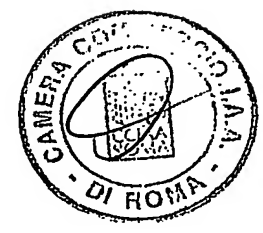


Fig. 3c

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*olga capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B).



5/7

RM 2002 A 000049

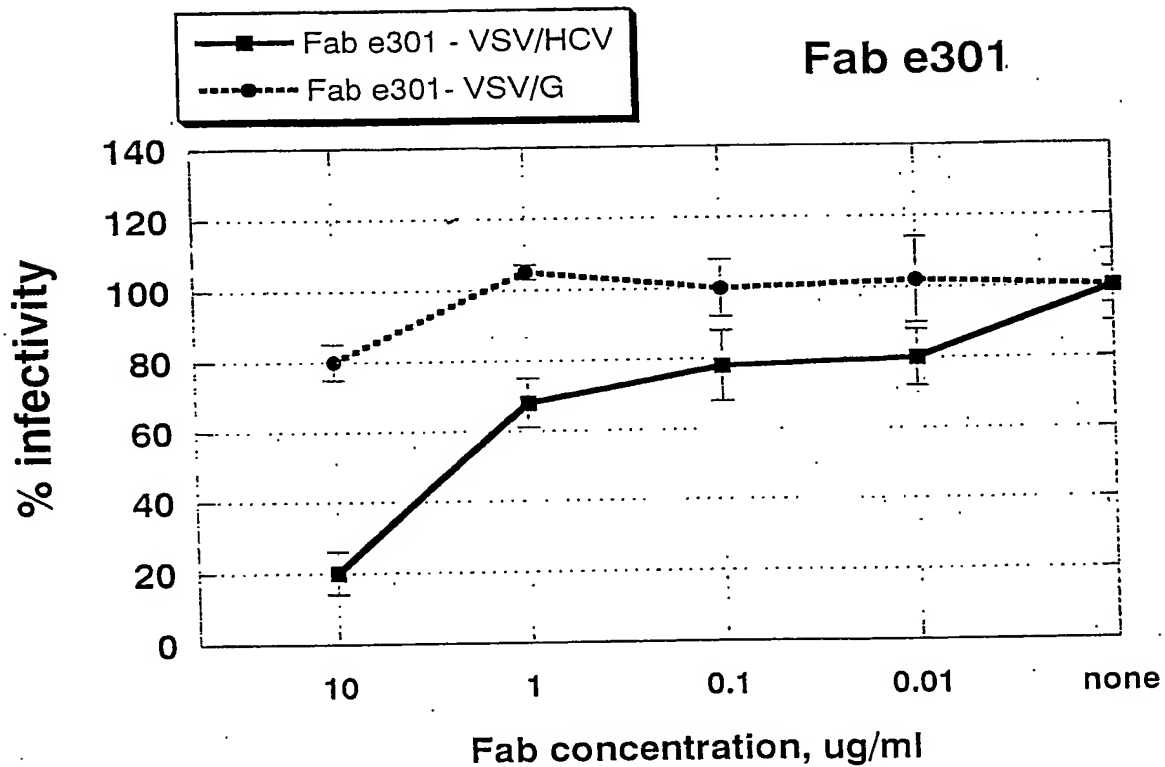
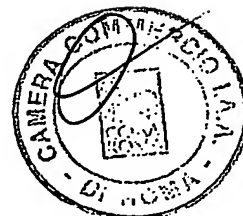


Fig. 3 b

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



6/7



RM 2002 A 000049

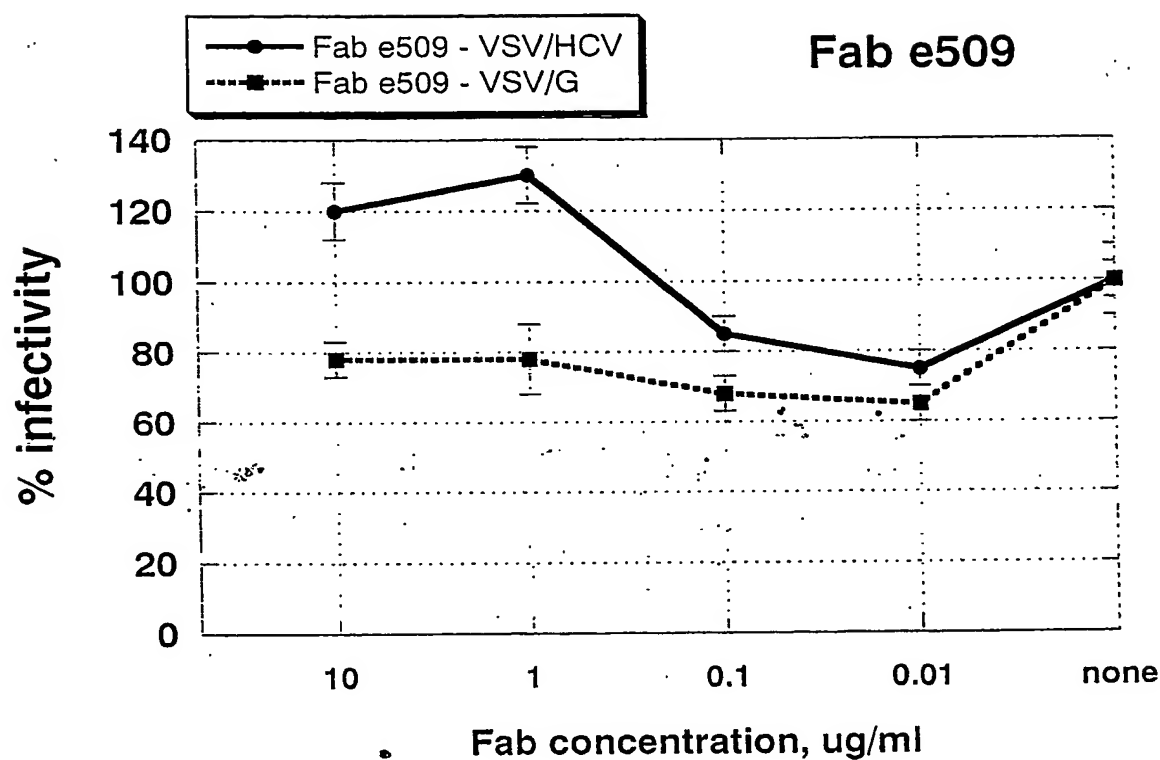
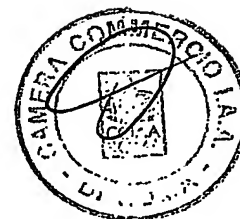


Fig. 3c

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



7/7

RM 2002 A 000049

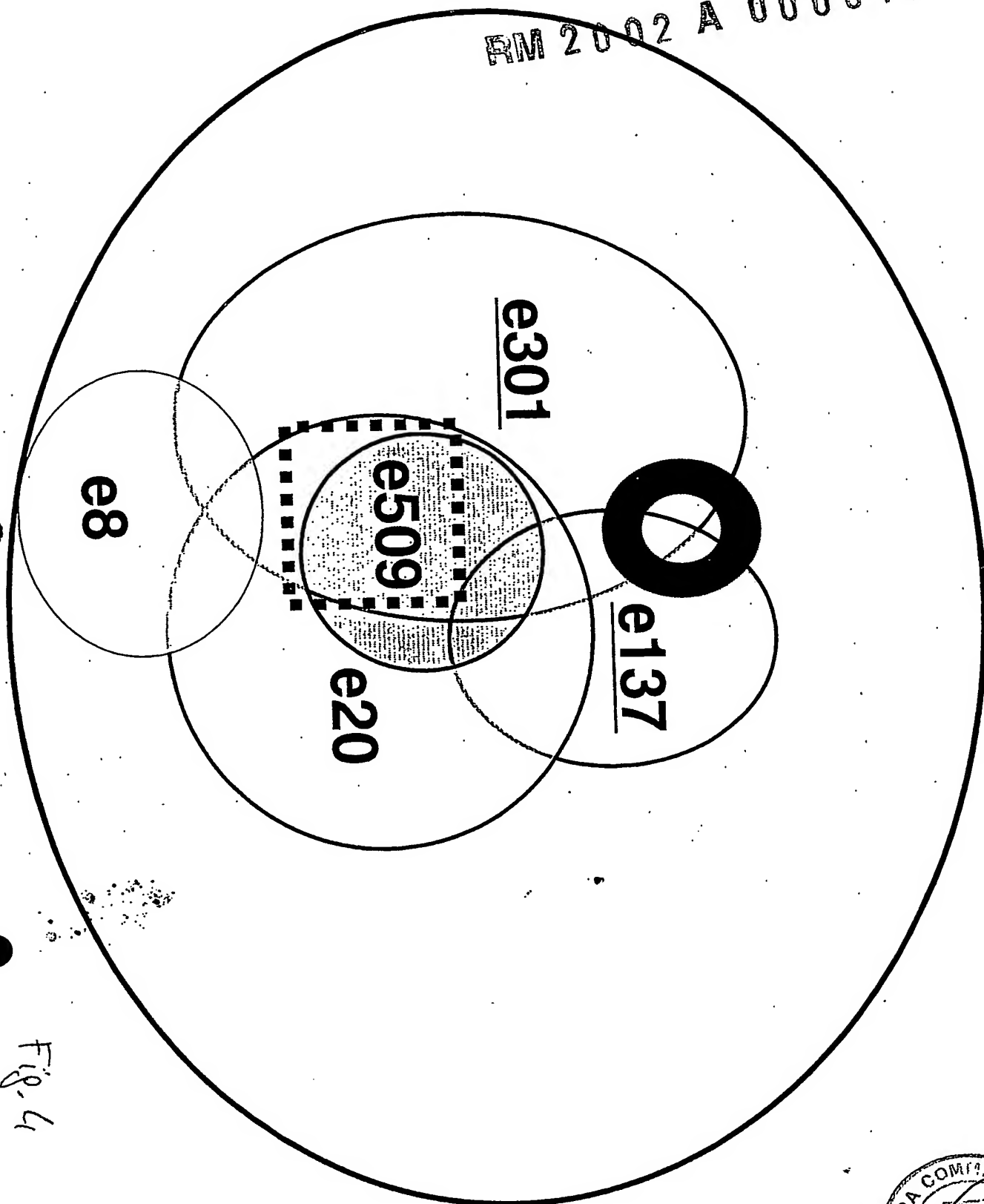


Fig. 4

p.p.: BIOSTRANDS S.r.l.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

